Luciana de Araújo Pimenta

**Efeito da Crotoxina na Ação Moduladora dos
Macrófagos Sobre Eventos da Neovascularização. Ensaios *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio
Vessoni

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

PIMENTA, L. A. **Efeito da Crotoxina na ação moduladora dos macrófagos sobre eventos da neovascularização. Ensaios *in vitro***. 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crotoxina (CTX), toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeito supressor sobre o crescimento tumoral, além de acarretar ação imunomodulatória, particularmente sobre a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a CTX estimula a capacidade secretória de macrófagos peritoneais obtidos de animais portadores de tumor de Walker 256 no flanco superior. Esse aumento é acompanhado por significativa diminuição da massa tumoral. Adicionalmente, ensaios *in vitro*, demonstraram que macrófagos previamente tratados com CTX inibem a proliferação de células tumorais, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, secreção de IL-1 β e a geração da LXA₄ e 15-epi-LXA₄. Além da ação sobre a proliferação de células tumorais, os macrófagos também influenciam em outros eventos do processo tumoral, como por exemplo, a neovascularização. Assim, considerando a ação imunomodulatória da CTX, a importância central do macrófago na gênese e progressão tumoral e a participação desta célula no microambiente estromal, o objetivo geral do presente projeto foi investigar se a atividade secretória de macrófagos tratados com CTX interfere nos eventos-chave da neovascularização, tais como a adesão, migração e proliferação de células endoteliais. Para tanto, macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de ratos machos da linhagem Wistar. Esses macrófagos foram aderidos e tratados com CTX (0,3 μ g/mL), por 2 horas e, em seguida incubados em meio fresco por 24 horas. Após esse período, macrófagos tratados com CTX ou sobrenadantes obtidos dessas células foram adicionados às culturas de células endoteliais tímicas (t.End.1) e os seguintes parâmetros, utilizando modelo de angiogênese *in vitro*, foram avaliados: 1) a capacidade proliferativa das células endoteliais; 2) o comportamento de adesão da célula endotelial aos seus ligantes naturais (colágeno tipo I-10 μ g/mL, fibronectina-3 μ g/mL e laminina-10 μ g/mL); 3) a migração da célula endotelial sobre colágeno tipo I (10 μ g/mL), utilizando os métodos de *Wound healing* e *Time Lapse*; 4) a formação de vasos induzidos em matrigel, no modelo 3D; 5) a liberação de VEGF e TNF- α , por macrófagos, por meio de ensaio imunoenzimático (EIA) e 6) o envolvimento de receptores peptídeo formil (FPRs) nas ações dos macrófagos sobre a proliferação e adesão de células endoteliais. Tanto os macrófagos tratados com CTX, como seus sobrenadantes inibiram a proliferação, adesão e o número de células migradas, bem como a velocidade de migração das células t.End.1 e, consequentemente, a formação de tubos no matrigel 3-D, acompanhadas pela diminuição da concentração de VEGF e TNF- α nos sobrenadantes de macrófagos tratados com a CTX. Ainda, o bloqueio dos receptores peptídeo formil aboliu as atividades inibitórias dos macrófagos tratados com a toxina, evidenciando a importância destes receptores para a ação da CTX sobre a atividade antiangiogênica de macrófagos.

Palavras-chave: Crotoxina. Macrófagos. Célula endotelial. Matriz extracelular. Adesão. Migração.

ABSTRACT

PIMENTA, L. A. **Crotoxin effect in modulating action of macrophages on angiogenesis. In vitro assays.** 2015. 80 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Crotoxin (CTX), the main component of *Crotalus durissus terrificus* snake venom has suppressive effect on tumor growth and immunomodulatory action, particularly on the macrophages function, key cells to the mechanisms of innate defense. Studies by our group have shown that CTX stimulates the secretory capacity of peritoneal macrophages obtained from tumor-bearing rats. This increase is accompanied by a significant tumor mass decrease. In addition, *in vitro* assays demonstrated that macrophages pretreated with CTX inhibit the tumor cells proliferation in co-culture model, mediated, in part, by H₂O₂ release and NO production, IL-1 β secretion and LXA₄ and 15-epi-LXA₄ generation. Besides the action on the tumor cells proliferation, macrophages influence also on other events of tumor process, such as neovascularization. Thus, considering the immunomodulatory action of CTX, the pivotal importance of macrophages in the genesis and tumor progression and participation of this cell in the stromal microenvironment, the objective of this project was to investigate the macrophages secretory activity treated with CTX on key events involved in the neovascularization such as the adhesion, migration and proliferation of endothelial cells. To this end, resident peritoneal macrophages were obtained from male Wistar rats. These macrophages were adhered and treated with CTX (0.3 μ g/mL) for 2 hours and then incubated in fresh medium for 24 hours. After this period, macrophages treated with CTX and supernatants from these cells were added to thymic (t.End.1) endothelial cells cultures, and the following parameters, using *in vitro* angiogenesis model were evaluated: 1) the proliferative capacity of the cells endothelial; 2) the endothelial cell adhesion behavior to their natural ligands (type I collagen-10 μ g/ml, fibronectin-3 μ g/ml and laminin-10 μ g/ml); 3) endothelial cell migration on type I collagen (10 μ g/ml) using the methods Wound healing and Time Lapse; 4) formation of capillary-like tube formation on matrigel-3D matrix; 5) VEGF and TNF- α release and 6) the involvement of the formyl peptide receptors (FPR) in the macrophages actions on the proliferation and adhesion of the endothelial cells. Both macrophages treated with CTX as their supernatants inhibited proliferation, adhesion and the number of migrated cells as well as cell migration velocity, evaluated in Time Lapse. Consequently, there was inhibition of the capillary-like tube formation on matrigel-3D matrix, accompanied by VEGF and TNF- α secretion decrease in the macrophage supernatant treated with CTX. Further, the FPRs blockade abolished the inhibitory activity of the macrophages treated with the toxin, suggesting the importance of these receptors to the action of CTX on the macrophages antiangiogenic activity.

Keywords: Crotoxin. Macrophages. Endothelial cell. Extracellular matrix. Adhesion. Migration.

1 INTRODUÇÃO

Os venenos animais contêm grande variedade de toxinas, em sua maioria peptídeos e proteínas, que são utilizadas para a captura de presas e como defesa. Ainda, são constituídos por misturas complexas de substâncias inorgânicas e orgânicas. Os constituintes inorgânicos incluem cálcio, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobre e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971). Os componentes orgânicos são representados principalmente por proteínas com propriedades enzimáticas, peptídeos biologicamente ativos e algumas moléculas não-proteicas que agem isolada ou sinergisticamente, interferindo em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos (LEE, 1979). Alguns destes componentes do veneno possuem vários efeitos tóxicos, sendo assim denominados toxinas, e estas são responsáveis por diversos efeitos biológicos, como distúrbios na coagulação sanguínea, hemólise, hemorragia local e sistêmica, hipertensão, efeitos neurotóxicos, necrose tecidual, entre outros (IWANAGA; SUZUKI, 1979; MARKLAND, 1998; TANEN et al., 2001; WALTER; BILDEN; GIBLY, 1999).

Apesar da sua toxicidade, vários trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de venenos de serpentes para o tratamento de diferentes patologias. Isto se deve ao fato de milhões de anos de evolução terem conferido a estas substâncias, duas características importantes para o desenvolvimento de um fármaco: especificidade e seletividade a seus alvos (celulares e moleculares, como canais iônicos, receptores, enzimas, membranas celulares ou vias metabólicas) (BAILEY; WILCE, 2001; CURY; PICOLO, 2006; LEWIS; GARCIA, 2003).

Desta forma, as toxinas animais se constituem em importantes ferramentas para o estudo das propriedades fisiológicas e farmacológicas destes alvos e para a compreensão de como a disfunção destes alvos podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças. Adicionalmente, estas toxinas, em decorrência de sua seletividade ou mesmo especificidade pelos seus alvos, são modelos importantes para o desenho de novos e eficazes agentes terapêuticos. Proteínas obtidas de veneno de serpentes são amplamente estudadas em diferentes áreas das Ciências da Vida. Interações diretas destes compostos com diferentes tipos celulares envolvem diversos mecanismos que resultam em ativação ou bloqueio de diversas funções fisiológicas celulares.

No início da década de 30, do século passado, foi relatado o emprego de venenos ofídicos como analgésicos, mostrando a eficácia do veneno de *Naja tripudians* e *Naja naja* em diminuir a dor de pacientes portadores de carcinoma e em retardar a evolução de algumas

neoplasias (MONAELESSER; TAGUE, 1933*, apud on (BRAZIL, 1950). Estes trabalhos repercutiram no meio médico brasileiro e nesta mesma década, estudos clínicos utilizando doses homeopáticas do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foram iniciados em pacientes portadores de algias, principalmente de origem neoplásicas (BRAZIL, 1934, 1950).

1.1 Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e suas toxinas isoladas

O gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 7,5% dos acidentes ofídicos no Brasil (SINAN, 2013), sendo estes acidentes causados principalmente pela subespécie *Crotalus durissus terrificus*.

As manifestações clínicas do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus* são decorrentes particularmente, da atividade neurotóxica do veneno e são caracterizadas pelo aparecimento do chamado “*facies miastênico*” ou “*facies neurotóxico*”, onde se observam ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (ROSENFELD, 1971). Além disso, em decorrência desta atividade neurotóxica, é observada também insuficiência respiratória (AMARAL; MAGALHÃES; DE REZENDE, 1991; ROSENFELD, 1971). Além desta atividade, o veneno destas serpentes possui atividades miotóxica e coagulante (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1988; NAHAS; MACFARLANE; DENSON, 1964; ROSENFELD, 1971;), induzindo o quadro de rabdomiólise generalizada e incoagulabilidade sanguínea (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 1987; SANO-MARTINS et al., 2001).

Apesar destes efeitos sistêmicos importantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (AMORIM; FRANCO DE MELLO; SALIBA, 1951; BRAZIL, 1934) e são relatados ainda, ausência de dor ou dor de pequena intensidade, seguida de parestesia local (ROSENFELD, 1971). Como citado acima, além de não causar dor, (BRAZIL, 1934, 1950) evidenciou que este veneno é capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado no início do século passado, no tratamento de algias de origem neoplásica.

As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina. A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotoxina (CTX), seu

* MONAELESSER; TAGUE. *Trailement des algies et des tumeurs, par el venin de cobra. Bull. De l'Acd. De Médecine*, p371, 1933

principal componente tóxico (BRAZIL, 1972), contribuindo com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total.

Isolada por (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938), a CTX teve a sua estrutura descrita por (FRAENKEL-CONRAT; SINGER, 1956) sendo uma β -neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: um ácido denominado crotapotina (CA) e uma base denominada fosfolipase A_2 (FLA₂-CB) (**Figura 1**). Corresponde a 60% do veneno total e seu peso molecular é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (BRAZIL, 1972; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; STOCKER, 1990).

Figura 1. Estrutura de cristal do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (isoforma CA₂CB_b). Diagrama mostra a estrutura global do complexo CA₂CB_b. A subunidade CB_b básica (azul) é mostrada na orientação frente-face canônica do grupo estruturas IIA PLA₂. As cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto α , β e γ da subunidade ácida CA₂ são mostradas em laranja, verde e vermelho, respectivamente. A cristalografia mostra uma estrutura de suporte único da associação de suas subunidades. As duas principais hélices da subunidade CA₂ do complexo Crotoxina apresentam giro de 180° em relação ao eixo principal e canônica orientação face-frontal da subunidade CB (Faure, Xu e Saul, 2011).

A subunidade CB ou FLA₂ apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7, sendo constituída por uma cadeia única polipeptídica contendo 122 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfídicas. A subunidade CA (crotapotina) apresenta seu peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica. Foi demonstrado, por meio de estudos de caracterização e sequenciamento, que essa subunidade é formada por três cadeias polipeptídicas, α (39 resíduos), β (35 resíduos) e γ (14 resíduos), totalizando 88 resíduos de aminoácidos, unidas por sete pontes dissulfídicas (AIRD et al., 1986; FAURE; XU; SAUL, 2011).

A CTX exerce seu efeito por meio da associação da fração FLA₂ aos seus alvos, levando à dissociação ao complexo, onde CA permanece em solução, enquanto CB interage com seus aceptores. Foram realizados estudos com intuito de compreender a ligação da CTX às membranas pré-sinápticas, e esclarecer a participação da subunidade CA. Délot e Bon (1992) observaram que CA participa temporariamente da etapa na qual CB se associa com seu aceptor na membrana, formando um complexo ternário transitório. A subunidade CA só se dissocia de CB após o acoplamento irreversível deste componente ao aceptor na membrana das terminações nervosas.

Apesar da função de CA não estar totalmente evidenciada, é aceito que ela pode agir como uma molécula carreadora potencializando a atividade letal de CB, porém sua atividade enzimática diminui dentro do complexo CTX (BON et al., 1989; CHOUMET et al., 1996; SANTOS et al., 2007). Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no VCdt ou na fração CTX. Esta fração possui maior atividade enzimática que o complexo CTX, porém com menor toxicidade, uma vez que maiores doses de CB, comparada com CTX ou veneno, são necessários para bloquear a transmissão neuromuscular (CHOUMET et al., 1996).

Vale ressaltar que foram identificados 16 diferentes isoformas da CTX, resultantes de uma associação aleatória de quatro isoformas de CA (CA₁, CA₂, CA₃ e CA₄) e quatro isoformas de CB (CBa₂, CB_b, CB_c e CB_d), e as combinações destas isoformas determinam a formação de diferentes complexos, responsáveis pelas propriedades farmacológicas e biológicas significativamente diferentes descritas para a Crotoxina (FAURE; XU; SAUL, 2011).

1.2 Estudos experimentais sobre os efeitos antitumoral e imunorregulatório da CTX

Vários estudos experimentais têm demonstrado que o VCdt ou a CTX, são capazes de modular as respostas inflamatória e imune (SAMPAIO et al., 2010).

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi demonstrada a ação antitumoral da CTX *in vivo*. Nestes estudos, o tumor foi induzido pela administração intraplantar, em ratos, de células do carcinoma de Walker 256. Em análises histopatológicas do coxim plantar de ratos tratados com a CTX, observou-se a diminuição do tamanho do tumor acompanhada por uma diminuição da formação de neovasos, sugerindo que esta toxina possa interferir com a neovascularização na vigência do tumor (BRIGATTE et al., manuscrito em elaboração). Em continuidade à caracterização da ação antitumoral da CTX, em ensaios *in vitro*, foi observada

a ação inibitória da toxina sobre eventos fundamentais da progressão tumoral, agindo diretamente sobre as células tumorais LLC WRC 256, linhagem correspondente ao tumor de Walker 256, inibindo a proliferação, adesão da célula tumoral à fibronectina, além de inibir a polimerização dos filamentos de actina e proteínas sinalizadoras da família das GTPases Rho, tais como a RhoA e a quinase FAK nestas células (FAIAD; DELLA-CASA; SAMPAIO, 2008). Da mesma forma que observado para as células tumorais, a CTX age diretamente sobre a função de células endoteliais, inibindo a proliferação, a adesão celular aos seus ligantes naturais, tais como colágeno I, fibronectina e laminina. Além disso, a formação de tubos no matrigel 3-D, a migração celular avaliada no modelo de cicatrização (*wound healing*) e quimiotaxia, tanto na presença de meio de cultura, como no meio condicionado de célula tumoral (KATO et al., 2013).

Ainda em relação aos mecanismos envolvidos com a ação antitumoral da CTX, nosso grupo investigou a ação desta toxina sobre a função modulatória de macrófagos durante a progressão tumoral. Nestes estudos, as células tumorais de Walker 256 foram injetadas no flanco de ratos e, após o surgimento da massa tumoral (5º dia da injeção das células tumorais), a injeção subcutânea da CTX restabelece a atividade secretória dos macrófagos peritoneais, uma vez que esta é reduzida pelo tumor. Neste sentido foi observado que a CTX aumenta a capacidade destas células em secretar mediadores pró-inflamatórios, tais como NO, H₂O₂ e citocinas, e tornando-as funcionalmente semelhantes aos macrófagos *M1* (inflamatórios). Estas alterações foram acompanhadas do incremento do metabolismo, induzido pela CTX sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e citrato sintase) e da oxidação de glicose e glutamina. Estas ações estimulatórias da CTX sobre a função e metabolismo de macrófagos são de longa duração, pois foram observadas por até 14 dias após a administração de uma única dose da toxina, acompanhadas de significativa inibição do crescimento do tumor (FAIAD, 2012).

Em continuidade a esse estudo, ensaios *in vitro*, aonde macrófagos tratados com CTX e co-cultivados na presença das células tumorais da linhagem LLC WRC 256 foi observado aumento da produção de reativos do oxigênio (H₂O₂) e do nitrogênio (NO), e da secreção de IL-1 β por macrófagos. Ainda, neste mesmo estudo foi observado aumento da produção de mediadores lipídicos Lipoxina A₄ e análogo mais estável 15-epi-LXA₄, que resultou no decréscimo da proliferação das células tumorais (COSTA et al., 2013).

Apesar destas evidências, até o momento, não foi demonstrada a importância da ação da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos no controle do desenvolvimento tumoral,

particularmente sobre a neovascularização, processo essencial para o crescimento e sobrevivência do tumor. Este estudo contribuirá de maneira importante para a caracterização dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral descrita para esta toxina.

1.3 Angiogênese tumoral – Aspectos Gerais

É bem estabelecido que a angiogênese, processo de formação de neovasos a partir da vasculatura existente é fundamental para o crescimento e metástase tumoral (FOLKMAN, 1992; HANAHAN; FOLKMAN, 1996). A migração de células tumorais para tecidos distantes ocorre por meio de vasos sanguíneos e linfáticos, portanto, são os maiores componentes do microambiente tumoral (HE et al., 2005). A formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e vasos linfáticos (linfangiogênese) ocorre a partir de vasos pré-existentes estimulados por fatores pró-angiogênicos expressos pelo microambiente tumoral (FOLKMAN, 2007; ONIMARU; YONEMITSU, 2011).

No tumor, as células endoteliais vasculares (CEVs) proliferam de 50 a 100 vezes mais de cem células tumorais (DASS; TRAN; CHOONG, 2007). A angiogênese é um processo-chave no crescimento tumoral e necessário para a manutenção do tumor quando este está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm^3 (DVORAK, 1986). Este processo pode ser dividido em quatro etapas: 1) digestão de componentes da matriz extracelular e ativação de células endoteliais; 2) invasão e migração de células endoteliais; 3) proliferação de células endoteliais e 4) formação de tubos tipo capilares e diferenciação em vasos maduros. Estas etapas são moduladas por fatores derivados tanto das células tumorais quanto por células do microambiente tumoral e ainda são essenciais para a angiogênese associada à remodelagem e à nutrição do crescimento tumoral (DAVIS et al., 2005; ELICEIRI; CHERESH, 2001).

A adesão celular é um processo complexo, que envolve o contato inicial de uma célula a uma superfície, coordenado pela ligação do receptor ao ligante, pela polimerização da actina, e, finalmente, pelo estabelecimento de um estado de boa propagação celular (REINHART-KING, 2008). Esta interação é mediada pela ligação da integrina à matriz extracelular.

As integrinas são proteínas heterodiméricas, composta por subunidades α e β , associadas por ligação não-covalente, da superfície celular que reconhecem ligantes específicos da matriz extracelular (ELICEIRI; CHERESH, 1999; MIRANTI, 2002; NOGUERA et al., 2012). Essas proteínas não servem apenas para ancorar as células em suas

matrizes, mas também funcionam como transdutores de sinais químicos e mecânicos entre os ambientes intracelulares e extracelulares (MIRANTI, 2002).

Estudos focam na interação específica entre integrinas endoteliais com seus respectivos ligantes presentes na matriz extracelular, incluindo colágeno, laminina e fibronectina, sendo que estes componentes se ligam a subunidades de integrinas distintas (REINHART-KING, 2008). Demonstrou-se na **Tabela 1**, cada ligante, às diferentes integrinas.

Tabela 1. Integrinas das células endoteliais e ligantes

Integrin Subunits	ECM Ligands
$\alpha 1\beta 1$	collagen/laminin
$\alpha 2\beta 1$	collagen/laminin
$\alpha 3\beta 1$	laminin
$\alpha 5\beta 1$	fibronectin
$\alpha 6\beta 1$	laminin
$\alpha v\beta 3$	vitronectin/fibronectin
$\alpha v\beta 5$	vitronectin

Principais integrinas envolvidas na regulação dos processos de vasculogênese e angiogênese (Reinhart-King, 2008).

A adesão e migração celular têm sido extensivamente estudadas em sistemas de cultura de dimensional (2D) e descritas como processos de passos múltiplos (RIDLEY et al., 2003). Todos estes passos são um processo cíclico, com base na coordenação da adesão celular a matriz e a capacidade da célula para contrair o seu corpo de modo que ele possa se projetar.

Nestes eventos, a actina é o principal componente do citoesqueleto das células endoteliais, composto de subunidades globulares monoméricas (G-actina) de 43-kDa que se polimerizam em filamentos helicoidais (F-actina), estruturas fundamentais para a remodelação constante do citoesqueleto durante a migração, por meio da projeção de estruturas como filopódios e fibras de *stress*. As filopódias são projeções membrânicas que contêm longos filamentos de actina dispostos em feixes paralelos e próximos. Essas estruturas agem como sensores de estímulos de motilidade. Classicamente, a formação de filopódia é regulada por ativação da pequena GTPase Cdc42 que se associa com proteínas da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASPs). As lamelipódias são saliências citoplasmáticas que se formam na extremidade principal de espraio ou migração celular. Estas saliências são de

aproximadamente 1 a 5 μm de largura e cerca de 2 μm de espessura e estão associadas de forma importante com a polimerização de actina. As lamelipódias são coordenadas pela sinalização envolvendo a GTPases Rac e o complexo Arp2/3, provoca a nucleação a partir da extremidade (-), permitindo a rápida extensão da extremidade (+) e também pode se ligar à lateral de outro filamento de actina, dando origem a uma rede ramificada responsável pelo direcionamento dos filamentos de actina para sua ancoragem no citoesqueleto. Fibras de *stress* são filamentos de actina de polaridade invertida, ou seja, responsáveis pela atividade contrátil do citoesqueleto e são ligadas por α -actinina e miosina e distribuídas ao longo de fibras contráteis. Todas as 3 estruturas são essenciais para conduzir as várias etapas da motilidade associada à actina das células endoteliais, como demonstrado na **Figura 2**. Desta forma, considera-se que as funções de adesão celular e migração estão fortemente associadas (LADOUX; NICOLAS, 2012).

A migração celular pode ser representada e dividida em diferentes eventos: (1) detecção dos sinais pela filopódia; (2) formação e protrusão da lamelipódia e extensão para frente; (3) fixação das protrusões na matriz extracelular (MEC); (4) a contração mediada por *stress-fiber* do corpo celular para permitir que o progresso para frente; (5) liberação posterior, e (6) “reciclagem” da parte adesiva e sinalizadora da célula (LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007).

Figura 2. Representação esquemática das diferentes etapas de migração celular em substratos 2D. 1. Polimerização de filamentos de actina em projeção para a migração, traduzido em vigor protrusivo. 2. As protrusões da membrana facilitam a ligação de receptores transmembrânicos da superfície celular aos componentes de substrato. Novas aderências são rapidamente ligadas à rede de filamentos de actina. 3. A atividade combinada entre movimento retrógrado da actina e forças contráteis produzidos pelas fibras de estresse gera tensão para puxar o corpo da célula para frente. 4. As forças produzidas pela rede contrátil combinada com filamentos de actina e desarranjo das adesões focais ajudam a retrain a borda da célula em migração. Imagem cortesia do Instituto Mechanobiology, Universidade Nacional de Singapura. Por Ladoux and Nicolas, em Rep. Prog. Phys. (75), 2012 e Lamalice et al., em Circ Res. (30), 2007, Review.

Durante a angiogênese tumoral, os vasos organizam-se em uma rede de capilares e adquirem suas características estruturais e funcionais (CUENOD et al., 2006). Este processo de neovascularização é dependente de um delicado balanço entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos secretados tanto por células tumorais, células endoteliais, bem como outras células estromais, tais como macrófagos (GOMES et al., 2013).

Diversos trabalhos apontam a relevância dos estudos que demonstram como a população celular estromal pode afetar a angiogênese e a linfangiogênese tumoral, uma vez que a interação entre as células estromais, tais como, linfócitos, células dendríticas, macrófagos com células tumorais é crucial para o estabelecimento e desenvolvimento tumoral (POLYAK; HAVIV; CAMPBELL, 2009).

1.4 Características gerais dos Macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de (MACKANESS, 1970), a atividade secretória desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (MOORE; METCALF; 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (VAN FURTH, 1989), a partir da célula precursora para monócitos e neutrófilos, a CFU-GM (*colony-forming unit, granulocyte-macrophage*) (METCALF, 1971). A primeira célula da linhagem monocítica na medula óssea, morfológicamente, é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (VAN FURTH; DIESSELHOFF-DEN DULK; 1970; VAN FURTH et al., 1980). O pró-monócito, ao se dividir, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, e a seguir passam para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, onde permanecem por cerca de 70 horas no homem (WHITELAW, 1966) e 25 horas, no camundongo (VAN

FURTH; COHN, 1968). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, onde se diferenciam em macrófagos. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade espraçamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisozima, proteinases neutras e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (COHN, 1978; TAKEMURA; WERB, 1984).

O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (VAN FURTH; COHN, 1968) e é considerada uma célula terminal, sem capacidade de proliferação (GORDON, 1986), embora em algumas ocasiões, tal fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (TARLING; LIN; HSU, 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (VAN FURTH; DIESSELHOFF-DEN DULK; MATTIE, 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por processo de diferentes estágios de ativação (COHN, 1978; GORDON, 1986; NATHAN, 1987; WERB et al., 1986), definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (ADAMS, HAMILTON, 1984). Exemplos de funções complexas incluem a quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígeno, lise de parasitas intracelulares e capacidade tumoricida (MANTOVANI et al., 2002).

1.5 Macrófagos, Angiogênese e Microambiente Tumoral

Em tumores sólidos, principalmente em carcinoma, as lesões primárias e as metástases são infiltradas por grande quantidade de leucócitos, tais como linfócitos T (helper, supressor e citotóxico), células B, *natural killer* (NK) e, principalmente por macrófagos os quais correspondem aproximadamente 80% do total de células associadas ao tumor (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; SIVEEN; KUTTAN, 2009; WANG et al., 2006). Durante o desenvolvimento do tumor, diferentes subpopulações de macrófagos foram identificados dentro de uma massa tumoral, uma vez que fatores quimiotáticos derivados de células neoplásicas recrutam monócitos circulantes que se localizam em diferentes nichos do tumor (LEWIS; POLLARD, 2006). Essas células atraem um recrutamento de novos monócitos circulantes ativados, que amplificam as subpopulações de macrófagos no ambiente tumoral (VAN OVERMEIRE et al., 2014). Dentre estas, estão *Macrófagos Associados ao Tumor*

(*tumor-associated macrophages*-TAMs) que suportam a progressão tumoral e metástase, à medida que secretam fatores de crescimento pró-angiogênicos (RAHAT; HEMMERLEIN, 2013) e ainda, contribuem com o suprimento de nutrientes, troca gasosa e eliminação de metabólitos. Outro subconjunto são os TEMs (*Tie-2 expressing monocytes*), que ao contrário de TAMs residem muito perto de vasos sanguíneos (VENNERI et al., 2007), mas são semelhantes aos TAMs em relação a secreção de fatores pró-angiogênicos.

Experimentalmente foi demonstrado que a instalação do tumor no tecido subcutâneo induz o recrutamento de monócitos circulantes para o microambiente tumoral. Este recrutamento está associado ao declínio do número de macrófagos da cavidade peritoneal, decorrente da migração destas células para o sítio tumoral instalado no subcutâneo, o que demonstra que esta cavidade é uma importante rota para o tráfego de macrófagos ativados que migram para o sítio tumoral, controlando seu desenvolvimento (BHAUMIK et al., 2001).

Em relação à neovascularização tumoral, estudos recentes demonstraram que a interação entre células tumorais e TAMs intensifica as funções de adesão e migração das células endoteliais e, conseqüentemente, a formação de tubos, promovendo assim a progressão tumoral (WANG et al., 2013, ZHANG et al., 2012). Este complexo processo está representado pela **Figura 3**, proposta por (LEE; LIU; HUANG, 2006).

Estas células podem ser fenotipicamente, polarizadas em dois estágios distintos: o macrófago *M1* (ou *ativados classicamente*) que podem induzir a morte da célula tumoral (citotoxicidade ou apoptose) e/ou em macrófago *M2* (ou tipo II, *ativados alternativamente*), que podem estimular a capacidade invasiva das células tumorais (GORDON; TAYLOR, 2005; MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004).

O fenótipo M1 é comumente encontrado nas infecções e na inflamação crônica, sendo, portanto, pró-inflamatório. Esta célula é caracterizada pela liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e dos reativos intermediários do oxigênio (ROI). No contexto do tumor, os macrófagos M1 inibem o crescimento tumoral, erradicando as células tumorais e estimulando a resposta imune. Por outro lado, os macrófagos M2, encontrados quando o tumor está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm³ e a angiogênese torna-se necessária para sua manutenção (DVORAK, 1986). Neste contexto, os macrófagos M2 contribuem para a progressão do tumor por produzir mediadores pró-angiogênicos e mediadores anti-inflamatórios, além de proteases e fatores de crescimento (GORDON, 2003; LAMAGNA; AURRAND- LIONS; IMHOF, 2006; MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI et al., 2004; POLLARD, 2004; SICA et al., 2008).

Ainda, mudanças no metabolismo de glicose e glutamina dos macrófagos são fundamentais tanto para determinar o seu estado funcional e de ativação, quanto para alterarem as funções de outras células do microambiente tumoral (BISWAS; MANTOVANI, 2012), tais como as células endoteliais (MANTOVANI et al., 2013).

O estresse hipóxico na massa tumoral acarreta a expressão aumentada de moléculas inflamatórias (FOLKMAN, 1985), responsáveis tanto pelo recrutamento de outros macrófagos, como pela polarização destas células para o fenótipo M2 (angiogênicos).

Figura 3. Macrófagos na Angiogênese Tumoral. O infiltrado de macrófagos facilita a propagação tumoral por induzir a angiogênese tumoral e invasão de células tumorais. Quando um tumor sólido cresce mais do que 2 mm^3 de diâmetro, a simples difusão de oxigênio e nutrientes aos tecidos metabolizantes torna-se insuficiente. A presença de múltiplas áreas de hipóxia se torna uma característica comum de tumores sólidos. Muitos fatores são produzidos a partir das áreas de hipóxia. Os monócitos são então recrutados continuamente para dentro do tumor, diferenciados em TAM, e, em seguida, se acumulam nas áreas hipóxicas. Eventualmente, TAMs funcionam como o fornecedor de fatores tumorigênicos, e que auxiliam no crescimento tumoral, bem como VEGF, favorecendo a angiogênese. Esquema proposto por Lee, Liu, Huang. *Tumor-Associated Macrophage: It's Role in Tumor Angiogenesis* in **J. Cancer Mol.** Vol 2(4), 2006.

Em relação à neovascularização tumoral, os TAMs produzem fatores angiogênicos (LEE; LIU; HUANG, 2006): fatores de crescimento para fibroblastos (FGF e FGF2); fatores estimuladores de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF); fatores de crescimento tumoral- β (TGF- β); fatores de necrose tumoral- α (TNF- α); fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros (TANAKA et al., 2002; UENO et al., 2000; WHITE et al., 2001).

Além desses mediadores, os TAMs secretam proteases derivadas, liberadas no tumor, principalmente serino-proteases, tais como ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (KOCH et al., 1992) e metaloproteases (MMPs), os quais facilitam a angiogênese tumoral.

As MMPs são uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular, representadas principalmente pela collagenase (MMP-1), gelatinase A (MMP-2), estromelina (MMP-3), matrilisina (MMP-7) e gelatinase B (MMP-9) que em conjunto com a MMP-2 são as principais metaloproteases secretadas pelos TAMs (NAYLOR et al., 1994). Neste sentido, durante a progressão tumoral, a expressão dessas MMPs encontra-se aumentada no tumor, sendo os TAMs as maiores fontes de MMP-9, importantes para a intensificação da angiogênese, invasão e metástase tumoral (GRIMSHAW; WILSON; BALKWILL, 2002; KOCH et al., 1992; NAYLOR et al., 1994).

Descrita originalmente na década de 1970, como proteínas secretadas pelo tumor, potentes no aumento da permeabilidade microvascular, as proteínas da família VEGF são geralmente consideradas as mais importantes envolvidas no desenvolvimento da vasculatura e têm papéis essenciais na angiogênese e linfangiogênese durante os processos fisiopatológicos (BROWN et al., 1997; DVORAK et al., 1999).

O TNF- α , em conjunto com o VEGF e o TGF- β é uma das principais citocinas associadas à angiogênese tumoral, secretadas pelos macrófagos (KLIMP et al., 2002; LEE; LIU; HUANG, 2006). Esta citocina estimula a reparação, e pode tanto estimular o desenvolvimento de tumores, por meio de estímulo do crescimento de neovasos, como pode participar na destruição do tumor por citotoxicidade direta (LEIBOVICH et al., 1987).

Além de substâncias pró-angiogênicas, os macrófagos secretam, também, substâncias que inibem direta ou indiretamente o crescimento tumoral, tais como a lipoxina A₄ (LXA₄) e seu análogo estável (15-epi-LXA₄), mediadores lipídicos gerados na via da lipoxigenase. Esses mediadores apresentam importante ação inibitória sobre o crescimento tumoral (CALORINI et al., 2005) e a proliferação de células endoteliais (LEEDOM et al., 2010), além de suprimir fatores de crescimento angiogênicos e seus receptores, sendo, portanto, consideradas reguladores-chave da neoangiogênese tumoral (CLÀRIA, 2006).

As lipoxinas (LXs) foram identificadas por (SERHAN; HAMBERG; SAMUELSSON, 1984), em frações purificadas de suspensão de leucócitos. As LXs são rapidamente produzidas em resposta a diferentes estímulos e apresentam diversas bioatividades sobre leucócitos, estimulando a ativação de monócitos e macrófagos, os quais inibem a atividade de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Ainda, estes mediadores lipídicos modulam as atividades de células de origem não mielóides, incluindo fibroblastos, células endoteliais, epiteliais gastrointestinais,

mesangial renal e células dendríticas esplênicas (MCMAHON; GODSON, 2004). A LXA₄, bem como seus análogos naturais (ATLs), gerados a partir da acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2), na presença de aspirina ou outros substratos endógenos (citocromo P450 e espécies reativas de oxigênio), induz à formação estéreo-selectiva (40% de *R* e 60% da forma *S*) de lipoxinas 15-epi (15-Epi- LXA₄), que são mais potentes e mais estáveis do que a forma nativa LX contendo 15-S (CAPDEVILA et al., 1986; CLÀRIA, 2006; SPITE; CLÀRIA; SERHAN, 2014). Tanto a LXA₄ nativa quanto seus análogos estáveis exercem seus efeitos biológicos específicos após a ligação a receptores transmembrânicos, os ALXR (conhecidos também como receptores para peptídeo formil - *Formyl Peptide Receptors-FPRs*), acoplados à proteína G, identificados em vários tipos celulares, dentre eles, os macrófagos (FIORE et al., 1994; CHIANG; SERHAN, 2006).

Em conjunto, muitos desses fatores são agentes-chaves na progressão tumoral e os macrófagos desempenham participação fundamental na modulação da secreção dos mediadores pró e anti-angiogênicos. Portanto, o melhor entendimento da regulação e da função dos macrófagos no *crosstalk* com as células tumorais pode contribuir para estabelecer novas alternativas imunoterapêuticas para o controle do desenvolvimento tumoral (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; SIVEEN; KUTTAN, 2009).

1.6 Modelos experimentais para o estudo da interação entre células

Nos ensaios experimentais, utilizando os modelos *in vivo* é essencial mimetizar as condições naturais possíveis envolvidas no ambiente celular. Neste sentido, ao escolher um modelo para a realização de experimento *in vitro* é imprescindível os cuidados com a observação, mensuração e a manipulação das células para que o sistema *in vitro* reproduza o comportamento celular observado no ambiente *in situ*. No modelo de co-cultura, diferentes tipos celulares são agregados em um mesmo ambiente, promovendo a comunicação celular, importante para a regulação da fisiologia e diferenciação dessas células. Esta comunicação pode ocorrer por diferentes maneiras: via sinalização *parácrina* (sinais liberados por uma célula ligada a receptores de membrana de outras células), via sinalização *justacrina* (sinais expressos na membrana de uma célula são reconhecidos por receptores de membrana de outras células), ou por *comunicação juncional* (gap) (trocas na sinalização intracelular) (HENDRIKS; RIESLE; VAN BLITTERSWIJK, 2007). Quando diferentes tipos celulares estão co-cultivados as células podem interagir e se comunicarem por essas diferentes vias, dependendo da proximidade e habilidade de interação ou comunicação.

Por meio de ensaios em co-cultura Hauptmann *et al.* (1993), investigaram as interações entre as células tumorais e diferentes subpopulações de macrófagos murinos. Nestes estudos, foi investigado o comportamento proliferativo e migratório de células tumorais quando co-cultivadas com as subpopulações de macrófagos. Outros estudos focaram a participação do macrófago na angiogênese tumoral e inflamação (ONO, 2008), e ainda demonstra a importância da mediação química, como por exemplo, a mediação secretada por macrófagos no controle das respostas inflamatória e angiogênica, sugerindo novos alvos para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico.

Recentemente, foi demonstrado que meio de cultura condicionado obtido de co-culturas de macrófagos com células tumorais intensifica a migração das células endoteliais, bem como a formação de tubos tipo-capilares, demonstrando que a interação de células tumorais com macrófagos pode afetar o potencial angiogênico das células tumorais (WANG *et al.*, 2013).

Assim, considerando os diferentes estudos relatados na literatura, o modelo de co-cultura provou ser uma ferramenta *in vitro* fundamental para elucidar a importância de interações celulares na fisiologia, homeostasia, reparo e regeneração tecidual e a gênese e desenvolvimentos de diversas doenças, tais como o câncer (HENDRIKS; RIESLE; VAN BLITTERSWIJK, 2007).

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos no presente Projeto de pesquisa demonstraram que a CTX altera a atividade secretória de macrófagos, em particular, inibindo fatores pró-angiogênicos, levando à inibição dos eventos envolvidos na angiogênese, tais como proliferação, adesão e migração. Ainda, receptores para peptídeo formil participam de maneira importante das ações da CTX. Esta atividade antiangiogênica dos macrófagos pode ser crucial para a atividade antitumoral descrita para a CTX.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984. ISSN 0732-0582.

AIRD, S. D. et al. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, n. 2, p. 296-300, Sep 1986. ISSN 0003-9861.

AMARAL, C. F.; MAGALHÃES, R. A.; DE REZENDE, N. A. [Respiratory involvement secondary to crotalid ophidian bite (*Crotalus durissus*)]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 33, n. 4, p. 251-215, 1991 Jul-Aug 1991. ISSN 0036-4665.

AMORIM, M. F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. **Envenenamento Botrópico e Crotálico**: Mem. Inst. Butantan. 23: 108 p. 1951.

ARNAOUTOVA, I. et al. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angiogenesis**, v. 12, n. 3, p. 267-274, 2009. ISSN 1573-7209.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604-617, Aug 2008. ISSN 1474-1768.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985. ISSN 0041-0101.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987. ISSN 0041-0101.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med. (Fremantle)**, v. 13, n. 1, p. 28-36, Mar 2001. ISSN 1035-6851.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10124, 2010. ISSN 1932-6203.

BHAUMIK, S. et al. Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. **Exp. Cell Res.**, v. 266, n. 1, p. 44-52, May 2001. ISSN 0014-4827.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J. Pathol.**, v. 196, n. 3, p. 254-265, Mar 2002. ISSN 0022-3417.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Semin. Immunopathol.**, v. 35, n. 5, p. 585-600, Sep 2013. ISSN 1863-2300.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell Metab.**, v. 15, n. 4, p. 432-437, Apr 2012. ISSN 1932-7420.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989. ISSN 0326-6656.

BORASCHI, D. et al. Endothelial cells express the interleukin-1 receptor type I. **Blood**, v. 78, n. 5, p. 1262-1267, Sep 1991. ISSN 0006-4971.

BRAZIL, V. **Do emprego a peçonha em terapêutica**. São Paulo: Biologia Medica. I: 7-21 p. 1934.

_____. **Do emprego da peçonha em terapêutica**. São Paulo: Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia. 60: 398-408 p. 1950.

BRAZIL, V. O. Neurotoxins from the South American Rattle Snake Venom. **J. Formosan Med. Assoc.**, v. 71, p. 394-400, 1972.

BROWN, L. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. **EXS**, v. 79, p. 233-269, 1997. ISSN 1023-294X.

CALORINI, L. et al. Inhibition of lipoxygenase pathway in macrophages co-cultivated with tumor cells. **Cancer Lett.**, v. 223, n. 1, p. 151-158, Jun 2005. ISSN 0304-3835.

CAPDEVILA, J. et al. Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P-450. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 141, n. 3, p. 1007-1011, Dec 1986. ISSN 0006-291X.

CEZAR-DE-MELLO, P. F. et al. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 5, p. 956-965, Mar 2008. ISSN 0007-1188.

CHEN, J. J. et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 5, p. 953-964, Feb 2005. ISSN 0732-183X.

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. New mechanism for an old drug: aspirin triggers anti-inflammatory lipid mediators with gender implications. **Compr. Ther.**, v. 32, n. 3, p. 150-157, 2006. ISSN 0098-8243.

CHIRIELEISON, S. M. et al. Automated live cell imaging systems reveal dynamic cell behavior. **Biotechnol. Prog.**, v. 27, n. 4, p. 913-924, Jul 2011. ISSN 1520-6033.

CHO, H. J. et al. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model. **Breast Cancer Res.**, v. 14, n. 3, p. R81, 2012. ISSN 1465-542X.

CHOUMET, V. et al. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A2 from the venom of a South-American rattlesnake. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 197-202, 1996. ISSN 0065-2598.

CLÀRIA, J. Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. **Recent. Pat. Anticancer Drug Discov.**, v. 1, n. 3, p. 369-382, Nov 2006. ISSN 1574-8928.

COHN, Z. A. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **J. Immunol**, v. 121, n. 3, p. 813-816, Sep 1978. ISSN 0022-1767.

COSTA, E. S. et al. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167-178, Nov 2013. ISSN 1879-3150.

CUENOD, C. A. et al. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. **Abdom. Imaging**, v. 31, n. 2, p. 188-193, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0942-8925.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, n. 6, p. 924-929, 1988. ISSN 0035-9203.

CURY, Y.; PICOLO, G. Animal toxins as analgesics--an overview. **Drug News Perspect.**, v. 19, n. 7, p. 381-392, Sep 2006. ISSN 0214-0934.

DANSON, C. M. et al. Phosphorylation of WAVE2 by MAP kinases regulates persistent cell migration and polarity. **J. Cell Sci.**, v. 120, n. Pt 23, p. 4144-4154, Dec 2007. ISSN 0021-9533.

DASS, C. R.; TRAN, T. M.; CHOONG, P. F. Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 10, p. 927-936, Oct 2007. ISSN 0022-0345.

DAVIS, D. A. et al. Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4561-4568, Jun 2005. ISSN 0006-4971.

DENKER, S. P.; BARBER, D. L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. **J. Cell Biol.**, v. 159, n. 6, p. 1087-1096, Dec 2002. ISSN 0021-9525.

DURHAM, J. T.; HERMAN, I. M. Inhibition of angiogenesis in vitro: a central role for beta-actin dependent cytoskeletal remodeling. **Microvasc. Res.**, v. 77, n. 3, p. 281-288, May 2009. ISSN 1095-9319.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 315, n. 26, p. 1650-1659, Dec 1986. ISSN 0028-4793.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 237, p. 97-132, 1999. ISSN 0070-217X.

DÉLOT, E.; BON, C. Differential effects of presynaptic phospholipase A2 neurotoxins on Torpedo synaptosomes. **J. Neurochem.**, v. 58, n. 1, p. 311-319, Jan 1992. ISSN 0022-3042.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 9, p. 1227-1230, May 1999. ISSN 0021-9738.

_____. Adhesion events in angiogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 5, p. 563-568, Oct 2001. ISSN 0955-0674.

ENGBRING, J. A.; KLEINMAN, H. K. The basement membrane matrix in malignancy. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 465-470, Jul 2003. ISSN 0022-3417.

FAIAD, O. J. **Efeito da crotoxina sobre a função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral.** São Paulo. 2012

FAIAD, O. J.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C. **Lipoxin A4 contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor:** Annual Scientific Meeting. 65: 8.04 p. 2008.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **J. Mol. Biol.**, v. 412, n. 2, p. 176-191, Sep 2011. ISSN 1089-8638.

FIERRO, I. M.; KUTOK, J. L.; SERHAN, C. N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, n. 2, p. 385-392, Feb 2002. ISSN 0022-3565.

FIORE, S. et al. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 1, p. 253-260, Jul 1994. ISSN 0022-1007.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Adv. Cancer. Res.**, v. 43, p. 175-203, 1985. ISSN 0065-230X.

_____. The role of angiogenesis in tumor growth. **Semin. Cancer Biol.**, v. 3, n. 2, p. 65-71, Apr 1992. ISSN 1044-579X.

_____. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 4, p. 273-286, Apr 2007. ISSN 1474-1776.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 60, n. 1, p. 64-73, Jan 1956. ISSN 0003-9861.

FRANCELINO, A. **Estudo da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular nas células endoteliais tímica e sua participação na migração.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Alagoas. 2008

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmacol.**, v. 20, n. 7, p. 1549-1556, Jul 1971. ISSN 0006-2952.

GOMES, F. G. et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. **Life Sci.**, v. 92, n. 2, p. 101-107, Feb 2013. ISSN 1879-0631.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984. ISSN 0041-0101.

GORDON, S. Biology of the macrophage. **J. Cell Sci. Suppl.**, v. 4, p. 267-286, 1986. ISSN 0269-3518.

_____. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005. ISSN 1474-1733.

GRIMSHAW, M. J.; WILSON, J. L.; BALKWILL, F. R. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, n. 9, p. 2393-2400, Sep 2002. ISSN 0014-2980.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-364, Aug 1996. ISSN 0092-8674.

HAUPTMANN, S. et al. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 5, p. 1406-1415, Nov 1993. ISSN 0002-9440.

HE, Y. et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. **Cancer Res.**, v. 65, n. 11, p. 4739-4746, Jun 2005. ISSN 0008-5472.

HENDRIKS, J.; RIESLE, J.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Co-culture in cartilage tissue engineering. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 1, n. 3, p. 170-178, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1932-6254.

HERRERA, D. R. et al. Root canal content from primary endodontic infection and upregulation of gelatinases in fibroblast cells. **Int. Endod. J.**, Dec 2014. ISSN 1365-2591.

HOLLBORN, M. et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 48, n. 9, p. 4360-4367, Sep 2007. ISSN 0146-0404.

HOTCHKISS, K. A. et al. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, n. 13, p. 1191-1200, Nov 2002. ISSN 1535-7163.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in Snake Venom. In: LEE, C. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.52, 1979. cap. 4, p.61-158.

JEDINAK, A.; DUDHGAONKAR, S.; SLIVA, D. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 3, p. 242-249, Mar 2010. ISSN 1878-3279.

KATO, E. et al. **Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vivo assay.** XII Simpósio

Brasileiro de Matriz Extracelular/ VII Internacional Symposium on Extracellular Matrix: 44 p. 2013.

KLIMP, A. H. et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Ver. Oncol. Hematol.**, v. 44, n. 2, p. 143-161, Nov 2002. ISSN 1040-8428.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, n. 5089, p. 1798-1801, Dec 1992. ISSN 0036-8075.

LADOUX, B.; NICOLAS, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. **Rep. Prog. Phys.**, v. 75, n. 11, p. 116601, Nov 2012. ISSN 1361-6633.

LAMAGNA, C.; AURRAND-LIONS, M.; IMHOF, B. A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 4, p. 705-713, Oct 2006. ISSN 0741-5400.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ. Res.**, v. 100, n. 6, p. 782-794, Mar 2007. ISSN 1524-4571.

LEE, C.-C.; LIU, K.-J.; HUANG, T.-S. Tumor-Associated Macrophage: Its Role in Tumor Angiogenesis. **J. Cancer Mol.** 2(4): 135-140 p. 2006.

LEE, C.-Y. Snake Venoms. In: (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v.52, 1979

LEEDOM, A. J. et al. Endogenous LXA4 circuits are determinants of pathological angiogenesis in response to chronic injury. **Am. J. Pathol.**, v. 176, n. 1, p. 74-84, Jan 2010. ISSN 1525-2191.

LEIBOVICH, S. J. et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. **Nature**, v. 329, n. 6140, p. 630-632, 1987 Oct 15-21 1987. ISSN 0028-0836.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 605-612, Jan 2006. ISSN 0008-5472.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 2, n. 10, p. 790-802, Oct 2003. ISSN 1474-1776.

LINDE, N. et al. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. **J. Pathol.**, v. 227, n. 1, p. 17-28, May 2012. ISSN 1096-9896.

LÄMMERMANN, T. et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 51-55, May 2008. ISSN 1476-4687.

MACKANESS, G. B. The mechanism of macrophage activation. In: MUDD, S. (Ed.). **Infectious agents and host reactions**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1970. p.61.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.**, v. 229, n. 2, p. 176-185, Jan 2013. ISSN 1096-9896.

_____. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, v. 13, n. 7, p. 265-270, Jul 1992. ISSN 0167-5699.

_____. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec 2004. ISSN 1471-4906.

_____. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov 2002. ISSN 1471-4906.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, Dec 1998. ISSN 0041-0101.

MCMAHON, B.; GODSON, C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, n. 2, p. F189-201, Feb 2004. ISSN 1931-857X.

MEEROVITCH, K. et al. A novel RGD antagonist that targets both $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. **Vascul. Pharmacol.**, v. 40, n. 2, p. 77-89, Feb 2003. ISSN 1537-1891.

MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus. **J. Immunol.**, v. 180, n. 7, p. 4639-4647, Apr 2008. ISSN 0022-1767.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. **J. Cell Physiol.**, v. 77, n. 2, p. 277-280, Apr 1971. ISSN 0021-9541.

MIRANTI, C. K. Application of cell adhesion to study signaling networks. **Methods Cell Biol.**, v. 69, p. 359-383, 2002. ISSN 0091-679X.

MOORE, K. A. et al. Control of basement membrane remodeling and epithelial branching morphogenesis in embryonic lung by Rho and cytoskeletal tension. **Dev. Dyn.**, v. 232, n. 2, p. 268-281, Feb 2005. ISSN 1058-8388.

MOORE, M. A.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br. J. Haematol.**, v. 18, n. 3, p. 279-296, Mar 1970. ISSN 0007-1048.

NAHAS, L.; MACFARLANE, R. G.; DENSON, K. W. A STUDY OF THE COAGULANT ACTION OF EIGHT SNAKE VENOMS. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 12, p. 355-367, Dec 1964. ISSN 0340-5338.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 2, p. 319-326, Feb 1987. ISSN 0021-9738.

NAYLOR, M. S. et al. Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. **Int. J. Cancer**, v. 58, n. 1, p. 50-56, Jul 1994. ISSN 0020-7136.

NOGUERA, R. et al. Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment. An update and overview. **Histol. Histopathol.**, v. 27, n. 6, p. 693-705, Jun 2012. ISSN 1699-5848.

ONIMARU, M.; YONEMITSU, Y. Angiogenic and lymphangiogenic cascades in the tumor microenvironment. **Front Biosci. (Schol. Ed.)**, v. 3, p. 216-225, 2011. ISSN 1945-0524.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci.**, v. 99, n. 8, p. 1501-1506, Aug 2008. ISSN 1349-7006.

PARKINSON, J. F. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 91-106, Apr 2006. ISSN 1871-5281.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 11, n. 9, p. 633-643, Sep 2010. ISSN 1471-0080.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 71-78, Jan 2004. ISSN 1474-175X.

_____. Trophic macrophages in development and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 259-270, Apr 2009. ISSN 1474-1741.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends Genet.**, v. 25, n. 1, p. 30-38, Jan 2009. ISSN 0168-9525.

RAHAT, M. A.; HEMMERLEIN, B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Front. Physiol.**, v. 4, p. 144, 2013. ISSN 1664-042X.

RAMOS, F. **Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Alagoas. 2008

RANGEL-SANTOS, A. et al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, Jun 2004. ISSN 0041-0101.

REINHART-KING, C. A. Endothelial cell adhesion and migration. **Methods Enzymol.**, v. 443, p. 45-64, 2008. ISSN 1557-7988.

RIABOV, V. et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Front. Physiol.**, v. 5, p. 75, 2014. ISSN 1664-042X.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704-1709, Dec 2003. ISSN 1095-9203.

ROSENFELD, G. **Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido**. São Paulo: *Mem. Inst. Butantan*. 20: 329-335 p. 1947.

_____. Symptomatology, Pathology, and Treatment of Snake Bites in South America. In: BÜCHERL, W. e BUCKLEY, E. E. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, v.2, 1971 cap. 34, p.345-384.

SAMPAIO, S. C. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 313-321, Mar 2006. ISSN 0041-0101.

_____. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, Jun 2003. ISSN 0041-0101.

_____. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, Jun 2010. ISSN 1879-3150.

_____. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 909-919, Jun 2006. ISSN 0041-0101.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **QJM**, v. 94, n. 10, p. 551-559, Oct 2001. ISSN 1460-2725.

SANTOS, K. F. et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A2. **Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun**, v. 63, n. Pt 4, p. 287-290, Apr 2007. ISSN 1744-3091.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 17, p. 5335-5339, Sep 1984. ISSN 0027-8424.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 18, n. 5, p. 349-355, Oct 2008. ISSN 1096-3650.

SINAN. **Acidente por Animais Peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação** 2013.

SIVEEN, K. S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunol. Lett.**, v. 123, n. 2, p. 97-102, Apr 2009. ISSN 1879-0542.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. **Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel**: Mem. Inst. Butantan. 56: 505-512 p. 1938.

SPITE, M.; CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. **Cell Metab.**, v. 19, n. 1, p. 21-36, Jan 2014. ISSN 1932-7420.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: RATON, B. (Ed.). **Medical Use of Snake Venom**. Florida, 1990. cap. 2, p.33-56.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v. 246, n. 1 Pt 1, p. C1-9, Jan 1984. ISSN 0002-9513.

TANAKA, Y. et al. Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer. **Hum. Pathol.**, v. 33, n. 11, p. 1105-1113, Nov 2002. ISSN 0046-8177.

TANEN, D. A. et al. Rattlesnake envenomations: unusual case presentations. **Arch. Intern. Med.**, v. 161, n. 3, p. 474-479, Feb 2001. ISSN 0003-9926.

TARLING, J. D.; LIN, H. S.; HSU, S. Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. **J. Leukoc. Biol.**, v. 42, n. 5, p. 443-446, Nov 1987. ISSN 0741-5400.

UENO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, n. 8, p. 3282-3289, Aug 2000. ISSN 1078-0432.

VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.**, v. 79, p. 125-150, 1989. ISSN 0070-2188.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v. 128, n. 3, p. 415-435, Sep 1968. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R.; DIESSELHOFF-DEN DULK, M. C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med.**, v. 138, n. 6, p. 1314-1330, Dec 1973. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R.; DIESSELHOFF-DEN DULK, M. M. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. **J. Exp. Med.**, v. 132, n. 4, p. 813-828, Oct 1970. ISSN 0022-1007.

VAN FURTH, R. et al. Characteristics, Origin and Kinetics of Human and Murine Mononuclear Phagocytose In: VAN FURTH, R. (Ed.). **Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects** London: Martinus Nijhoff Publishers by, The Hague, 1980. cap. 9, p.279-298.

VAN OVERMEIRE, E. et al. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallelisms with other tissues. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 127, 2014. ISSN 1664-3224.

VENNERI, M. A. et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5276-5285, Jun 2007. ISSN 0006-4971.

VIEIRA, A. M. et al. ATL-1, a synthetic analog of lipoxin, modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 90, n. 4, p. 388-396, Aug 2014. ISSN 1873-2968.

WALTER, F. G.; BILDEN, E. F.; GIBLY, R. L. Envenomations. **Crit. Care Clin.**, v. 15, n. 2, p. 353-386, ix, Apr 1999. ISSN 0749-0704.

WANG, X. et al. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. **J. Transl. Med.**, v. 4, p. 30, 2006. ISSN 1479-5876.

_____. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. **Cancer Sci.**, v. 104, n. 4, p. 516-523, Apr 2013. ISSN 1349-7006.

WANG, X. H. et al. Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. **Life Sci.**, v. 84, n. 7-8, p. 240-249, Feb 2009. ISSN 0024-3205.

WERB, Z. et al. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell Biol.**, v. 102, n. 3, p. 697-702, Mar 1986. ISSN 0021-9525.

WHITE, E. S. et al. Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. **J. Immunol.**, v. 166, n. 12, p. 7549-7555, Jun 2001. ISSN 0022-1767.

WHITELAW, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. **Blood**, v. 28, n. 3, p. 455-464, Sep 1966. ISSN 0006-4971.

WILLIAMS, R. L.; COURTNEIDGE, S. A.; WAGNER, E. F. Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. **Cell**, v. 52, n. 1, p. 121-131, Jan 1988. ISSN 0092-8674.

WU, S. H. et al. Lipoxin A4 inhibits TNF-alpha-induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 68, n. 1, p. 35-46, Jul 2005. ISSN 0085-2538.

ZARIC, J.; RÜEGG, C. Integrin-mediated adhesion and soluble ligand binding stabilize COX-2 protein levels in endothelial cells by inducing expression and preventing degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 2, p. 1077-1085, Jan 2005. ISSN 0021-9258.

ZHANG, B. et al. M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 8, p. 901-906, Aug 2012. ISSN 1980-5322.